

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-139579

(43)Date of publication of application : 22.05.2001

(51)Int.Cl.

C07D493/04  
A23L 3/3544  
A61K 31/34  
A61K 31/36  
A61P 39/06  
A61P 43/00

(21)Application number : 11-327924

(71)Applicant : SUNTORY LTD

(22)Date of filing : 18.11.1999

(72)Inventor : NAKAI MASAOKI  
NAKAHARA KOICHI  
MIKI WATARU

(54) LIGNAN-BASED ANTIOXIDANT AND METHOD FOR PRODUCTION THEREOF

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To solve a problem that it is necessary to convert methylenedioxyphenyl groups in a lignan compound to catechol groups to enhance antioxidant properties, as sesamin and the like, sorts of the lignan compounds, have weak activities to eliminate radicals such as active oxygen and the like, but it has been difficult to realize the aforesaid conversion by usual chemical syntheses.

SOLUTION: By reacting a lignan compound with water in a super critical condition, methylenedioxyphenyl groups in the lignan compound are converted to catechol groups and the resulted compound expresses remarkable antioxidant activities compared with sesamin or episesamin which are raw materials.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

23.01.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

**Japanese Publication for Unexamined Patent Application**

**No. 2001-139579/2001 (Tokukai 2001-139579)**

A. Relevance of the above-identified Document

The following is a partial English translation of exemplary portions of non-English language information that may be relevant to the issue of patentability of the claims of the present application.

B. Translation of the Relevant Passages of the Document

See the attached English Abstract.

[DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION]

[0001]

[INDUSTRIAL FIELD OF THE INVENTION]

The present invention relates to an antioxidant and a method for production thereof. More specifically, the present invention relates to a lignan compound, such as sesamin, whose antioxidant activity is enhanced by converting methylenedioxyphenyl groups in the lignan compound to catechol groups by Super-Critical Water degradation technology, and a method for production thereof. The antioxidative lignan compound obtained according to the present invention can give an antioxidant activity to foods, cosmetics, and drugs when added therein.

...

[PRIOR ART]

[0009]

Polyphenol compounds such as catechin, quercetin, ellagic acid, etc., which are widely present in plants have a catechol group in their molecules. Thus, it is considered that polyphenol compounds generally have antioxidant activity. On the other hand, as to compounds categorized into lignan compounds such as sesamin, pinoresinol, eudesmin, podophyllotoxin in which two C6-C3 compound (phenylpropanoid) units are oxidation-polymerized, many of these compounds have such chemical structures that a phenyl group is substituted with methylenedioxy group or methoxy group, and their antioxidant activities are weak. Therefore, it has been expected that the lignan compounds having an enhanced antioxidant activities would be obtained if catechol group, showing having an antioxidant property, was introduced in the lignan compounds.

...

[0035]

[EMBODIMENTS]

Especially, antioxidant activity evaluation showed that dicatechol compounds (which are represented by formulae (II) and (V) respectively) obtained from sesamin and episesamin respectively have elimination activities not only  $O_2^-$  but also  $\cdot OH$ . It was deduced that the elimination activity with respect to  $\cdot OH$  is attained because

these compounds have two catechol groups in their molecules.

[0036]

The antioxidant composition attained according to the present invention can be used as composition for treating and/or preventing various health impairments, sicknesses, and aging (such as cancer, inflammations, ischemic organopathy, arteriosclerosis, and the like) caused in bodies due to the effect of active oxygen. As to administration of the antioxidant composition, oral administration is most preferable. However, the administration may be intravenous, intra-abdominal, subcutaneous, intramuscular, or the like. Suitable forms of a drug for the oral administration are tablets, capsules, powders, granules, solutions, syrups, etc. But, the present invention is not limited to these forms of drugs. The composition may contain an appropriate diluent agent, binding agent, disintegrant, glazing agent, flavoring agent, coloring agent, solubilizing agent, suspending agent, coating agent, or the like, which is known in the art.

[0037]

The antioxidant composition obtained by the method according to the present invention can be used as external-application drugs for transdermal administration, or cosmetic, the external-application drugs being for treating or alleviating aging of skins or membranes, cancer or inflammations, or various skin- or mucosal membrane-related symptoms. Suitable forms of the external-application drugs or cosmetics may be

solution, poultice, compresses, etc. The external-application drugs may contain the pharmaceutically acceptable carrier such as diluent agent, flavoring agent, coloring agent, solubilizing agent, suspending agent, or the like.

[0038]

The antioxidant composition obtained by the Super-Critical Water degradation technology according to the present invention may be provided as a food. The antioxidant composition as foods is preferably in a powder form, granule form, paste form, jelly form, or the like. In case the antioxidant composition is a granule form or the like, sugar such as lactic acid may be added for sweetening the antioxidant composition. Moreover, the antioxidant composition obtained by the Super-Critical Water degradation technology according to the present invention may be provided as a drink. Into such a food or drink, a vitamin agent, inorganic component such as calcium or the like, an alcohol, or the like may be added. The scope of the food or drink includes foods for specific health care, foods for sick people, and the like.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2001-139579  
(P2001-139579A)

(43) 公開日 平成13年5月22日 (2001.5.22)

(51) Int.Cl.	識別記号	F I	テームコード* (参考)
C 0 7 D 493/04	1 0 1	C 0 7 D 493/04	1 0 1 C 4 B 0 2 1
A 2 3 L 3/3544		A 2 3 L 3/3544	4 C 0 7 1
A 6 1 K 31/34		A 6 1 K 31/34	4 C 0 8 6
31/36		31/36	
A 6 1 P 39/06		A 6 1 P 39/06	
審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 13 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平11-327924	(71) 出願人	000001904 サントリー株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号
(22) 出願日	平成11年11月18日 (1999.11.18)	(72) 発明者	中井 正晃 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社基礎研究所内
		(72) 発明者	中原 光一 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社基礎研究所内
		(74) 代理人	100089705 弁理士 社本 一夫 (外4名)
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 リグナン系抗酸化剤及びその製造法

(57) 【要約】

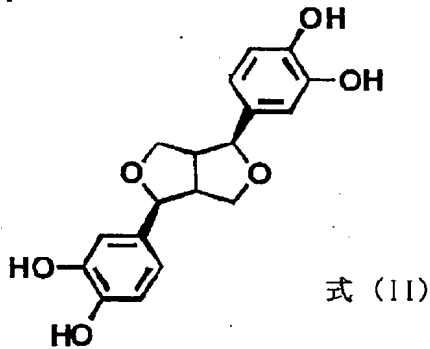
【課題】 リグナン化合物であるセサミンなどは活性酸素などのラジカルに対する消去活性が弱い。この抗酸化性を増強するためには、リグナン化合物中のメチレンジオキシフェニル基をカテコール基に変換することが必要であると考えられたが、従来の化学合成法では、そのような変換を行うことは困難であった。

【解決手段】 リグナン化合物を超臨界状態の水と反応させることにより、リグナン化合物中のメチレンジオキシフェニル基をカテコール基に変換することができ、その結果原料であるセサミンまたはエピセサミンと比較して、顕著な抗酸化活性を有することが示された。

【特許請求の範囲】

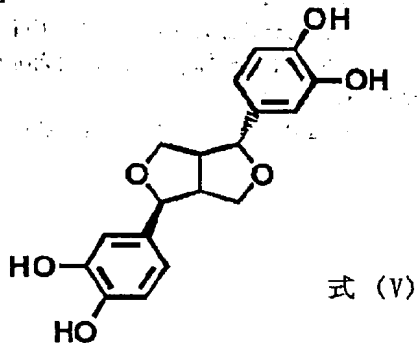
【請求項 1】 分子内に4つまたはそれ以上の水酸基を有するリグナン化合物。

【請求項 2】 リグナン化合物が、以下の式 (II) :  
【化 1】



で表される化合物である、請求項 1 に記載のリグナン化合物。

【請求項 3】 リグナン化合物が、以下の式 (V) :  
【化 2】



で表される化合物である、請求項 1 に記載のリグナン化合物。

【請求項 4】 請求項 1 に記載のリグナン化合物を有効成分とする、抗酸化組成物。

【請求項 5】 リグナン化合物が請求項 2 または 3 に記載された化合物である、請求項 4 に記載の抗酸化組成物。

【請求項 6】 出発リグナン化合物を超臨界水と反応させることにより、分子内に2つまたはそれ以上の水酸基を有するリグナン化合物を製造する方法。

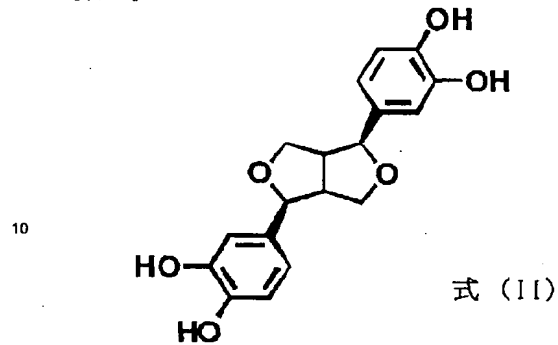
【請求項 7】 出発リグナン化合物を超臨界水と反応させることにより、メチレンジオキシフェニル基をカテコール基に変換することを特徴とする、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】 出発リグナン化合物がゴマ由来のリグナン化合物である、請求項 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 9】 出発リグナン化合物がセサミンまたはエピセサミンである、請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

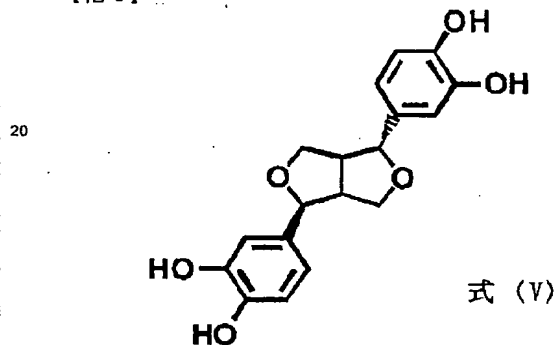
【請求項 10】 出発リグナン化合物を超臨界水と反応させることにより、下記の式 (II) :

【化 3】



または式 (V) :

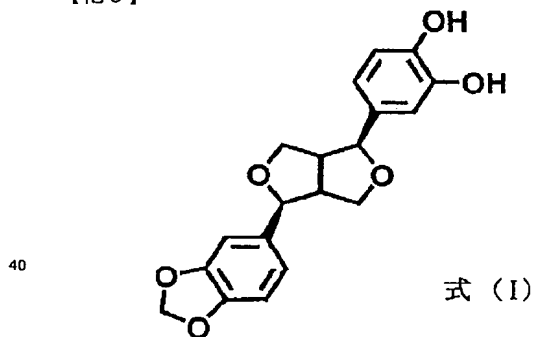
【化 4】



の化合物を製造する、請求項 6 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

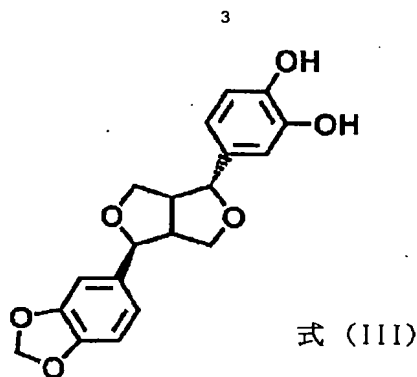
【請求項 11】 出発リグナン化合物を超臨界水と反応させることにより、下記の式 (I) :

【化 5】



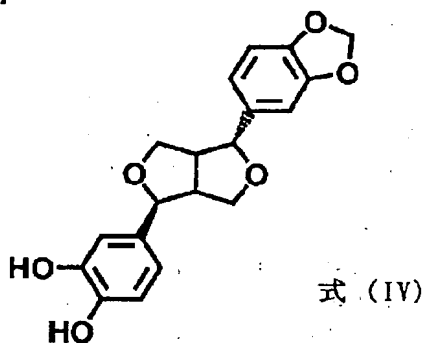
式 (III) :

【化 6】



または式 (IV) :

【化7】



の化合物を製造する、請求項6～9のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、抗酸化剤およびその製造方法に関するものである。さらに詳細には、超臨界水分解法を用いることにより、セサミンなどのリグナン化合物の分子内に存在するメチレンジオキシフェニル基をカテコール基に変換し、原料のリグナン化合物よりも抗酸化活性が増強されたリグナン化合物およびその製造方法に関する。本発明の方法により得られた抗酸化活性を有するリグナン化合物は、食品、化粧品および医薬品に配合し、抗酸化活性を付与することができる。

【0002】

【従来技術】生体にとって酸素は必要不可欠なものであるが、酸素が生体内で還元されて活性酸素と呼ばれる一群の反応性の高い分子種になると、生体内でタンパク質、核酸、脂質などの標的分子を酸化し、障害を与えることが知られている。生物はこの酸素による障害を防ぐため、活性酸素の生成量を低く保ち、さらに生成した活性酸素を消去することによって標的分子の酸化を防いでいる。

【0003】活性酸素としては、還元分子種であるスーパーオキシドアニオンラジカル ( $O_2^{\cdot-}$ )、過酸化水素 ( $H_2O_2$ )、ヒドロキシラジカル ( $\cdot OH$ ) および励起分子種である一重項酸素 ( $^1O_2$ ) などが知られている。また、細

4

胞成分、例えば不飽和脂肪酸の酸化物である不飽和脂肪酸ペルオキシラジカル ( $LOO\cdot$ )、不飽和脂肪酸ラジカル ( $L\cdot$ )、不飽和脂肪酸ヒドロペルオキシド ( $LOOH$ )、不飽和脂肪酸アルコキシラジカル ( $LO\cdot$ ) などと同じ酸化障害作用を示す物質として知られている。

【0004】生体内におけるこれら活性酸素の生成抑制や消去が十分に機能しない場合や、また活性酸素の生成が増加する物理的あるいは化学的な環境条件下では、活性酸素がタンパク質、核酸、脂質などの標的分子を酸化する。その結果、例えば老化、発癌、炎症、虚血性臓器障害、動脈硬化などの種々の障害や疾患が引き起こされる。生体内におけるこれらの活性酸素を消去する機構として、比較的寿命の長い  $O_2^{\cdot-}$ 、 $H_2O_2$ 、 $LOOH$  は酵素により、その他の寿命の短い活性酸素はアスコルビン酸などの低分子化合物により消去される機構が考えられている。

【0005】例えば赤血球内で生成した  $O_2^{\cdot-}$  はほとんどすべてスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) で消去され、 $H_2O_2$  はカタラーゼやペルオキシダーゼによって消去される。一方、 $^1O_2$  はβ-カロチンやトコフェロールによって消去される。また消去作用を有する低分子化合物には、活性酸素のみならず脂質ラジカルを含め有機ラジカルの消去にも作用するものもあり、したがって活性酸素の生成抑制にも作用する場合も多い。

【0006】活性酸素のうち、反応性が高く、生物に対する障害作用が最も大きいものは  $\cdot OH$  である。 $\cdot OH$  はほとんど細胞成分と拡散律速に近い速度で反応するため寿命が短く、これを消去する特別な機構を生物は持つことができないと考えられている。標的分子に接近して存在する成分でその損傷が生物に障害を与えないものは、ある程度  $\cdot OH$  の消去作用を持つが、生物はむしろ  $O_2^{\cdot-}$  や  $H_2O_2$  をできるだけ完全に消去し、さらに遷移金属イオンを  $\cdot OH$  生成を触媒しない形で存在させることにより、 $\cdot OH$  の生成を抑制し酸化障害を防いでいると考えられている。

【0007】これらの知見をもとにして、これまでに各種の抗酸化剤が開発されてきた。しかしながら実用化されているのは化学合成により工業的に製造されているものがほとんどである。例えば、ブチルヒドロキシアニソール (BHA) やブチルヒドロキシトルエン (BHT) などの合成抗酸化剤が一般に用いられている。しかし、これらの合成抗酸化剤は安全性に問題があるとされている (特開平7-82554)。

【0008】一方、天然物からも様々な抗酸化成分が見出されている。特に植物に広く含まれているフラボノイド類、例えば茶葉などに含まれているカテキンの抗酸化活性に関しては多くの報告がある (Chem. Pharm. Bull. 47, p.279-283 (1999); Biochimica et Biophysica Acta, 1427, p.13-23 (1999); および特開昭59-45385)。天然物由来の抗酸化剤は、野菜、果実、海藻、ハーブ、香辛料などから抗酸化成分を抽出し、これらに安



定剤、賦形剤を混合して粉粒状、錠剤または液体状の形態にして用いられている。しかしながら、これらの天然物を原料にした抗酸化剤は、水またはアルコールなどの有機溶剤などを用いて天然物素材より抽出した抽出物そのものを抗酸化剤として用いることが多く、活性物質が特定されていないものが多かった。

【0009】植物体に広く存在するカテキン、ケルセチン、エラグ酸のようなポリフェノール化合物は分子内にカテコール基を有しているため、一般的に抗酸化活性があるとされている。しかしながら、 $C_6-C_3$ 化合物（フェニルプロパノイド）を1単位として、これが2分子で酸化重合しているリグナン化合物に分類されるセサミン、ピノレジノール、オイデスミン、ポドフィロトキシンなどといった化合物は、それらの化学構造中に存在するフェニル基がメチレンジオキシ基やメトキシ基で置換されているものが多く、抗酸化活性が弱い。したがって、これらリグナン化合物に抗酸化性を示すカテコール基を導入することができれば抗酸化活性を増強したリグナン化合物が得られることが期待できた。

【0010】カテコール基は臭化アルミニウム（ $AlBr_3$ ）とエタンチオール（ $CH_3CH_2SH$ ）を用いた分解反応によりメチレンジオキシフェニル基から変換できることが知られている（Chem. Lett., 97, 1979）。しかしながら、メチレンジオキシフェニル基を有しかつベンジルエーテル基を有するようリグナン化合物、例えばセサミンなどに対して上記分解反応を適用すると、ベンジル位が優先的に反応しカテコール基を得られないことが判明した（図1）。すなわち従来の有機合成反応で用いられてきた手法では1つの反応工程でメチレンジオキシフェニル基をカテコール基に変換することは不可能とみられている。

【0011】また、セサミンやエビセサミンはBerozaらの方法（J. Am. Chem. Soc., 8, p.1242, 1955）、Takanoraらの方法（J. Chem. Soc., Chem. Commun., p.189, 1988）あるいはSuginomeらの方法（J. Org. Chem., 60, p.3052, 1995）により合成できることが知られている。よって、これらの方法を参考にしてメチレンジオキシフェニル基をカテコール基に置換したリグナン化合物の合成方法を考えられる。しかし、これらの合成方法では、多段階の反応工程で行うことが避けられない。

【0012】超臨界流体に関しては、抽出、精製、合成、分解と様々な応用研究がなされている。超臨界水に関しては、PCBやダイオキシンの無害化などの研究（特開平9-327678）がなされている。また、バイオマスの分解反応についても研究され、超臨界水を溶媒として用い、天然または合成高分子化合物を選択的に加水分解または熱分解してポリマー類を構成単位もしくはそれらのオリゴマー程度の結合体まで分解する方法が報告されている（特開平5-31000）。具体的には紙、木材、わらなどのポリマー資源中に大量に含まれているセルロースが

らのグルコース生成、あるいはリグニン系材料の低分子化が報告されている（特開平5-31000）。タンパク質を超臨界状態の水で加水分解して種々のアミノ酸を製造することもできる（特開平9-268166）。

【0013】しかしながら、リグナン化合物を超臨界状態の水と反応させることにより、分子内にカテコール基を有する化合物が得られることはこれまで知られていなかった。

【0014】

【発明により解決しようとする課題】従来の方法により分子内にカテコール基を導入し抗酸化性を付与した化合物を得るためには、有機合成化学で知られる手法のエタンチオールと臭化アルミニウムを用いてメチレンジオキシベンゼンをカテコールに変換する方法を適用することが考えられる。しかし、リグナン化合物のように分子内にベンジルエーテル部位を持つ化合物に対してこの方法を用いると、ベンジルエーテル部位が優先的に反応して開環し、目的とするカテコール基を持ったリグナン化合物を得ることができない。

【0015】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決する手段として、メチレンジオキシフェニル基を有するリグナン化合物を超臨界状態の水と反応させることにより、1つの工程でメチレンジオキシフェニル基をカテコール基に変換できることを見出し、本発明を完成した。本発明の方法では前述したベンジルエーテル部位を開裂させずにメチレンジオキシフェニル基のみに反応を起こさせることができる。この方法により得られたカテコール基を有する化合物は原材料よりも強い抗酸化性を示すものであり、抗酸化剤として産業的利用が期待できる。

【0016】

【発明の実施の態様】抗酸化剤は生体内で発生した活性酸素消去のためにも、また飲食物や医薬品などの安定化のためにも欠かせないものである。従来から安全性の高い天然素材由来の有効な抗酸化剤が望まれている。抗酸化活性の弱いリグナン化合物についても、分子内にカテコール基を導入することができれば良好な抗酸化活性を有するリグナン化合物となることが期待できた。

【0017】カテコール基の導入は、臭化アルミニウム（ $AlBr_3$ ）とエタンチオール（ $CH_3CH_2SH$ ）を用いてメチレンジオキシフェニル基をカテコール基に変換することにより可能であると考えられている。しかしながら、メチレンジオキシフェニル基を有しかつベンジルエーテル基を有するようリグナン化合物、例えばセサミンやエビセサミンなどに対してこの分解反応を適用するとベンジル位が優先的に反応し、カテコール基の導入ができなかった。

【0018】また、セサミンやエビセサミンについての有機合成方法は知られていることから、これらの方法を参考にしてカテコール基を有するリグナン化合物の合成

方法も考えられるが、多段階の複雑な反応工程を経なければならない。したがって、従来の有機合成反応で用いられてきた手法ではリグナン化合物中の2つのメチレンジオキシフェニル基をカテコール基に1工程で変換することは困難と考えられていた。そこで、近年広い分野でその応用が研究されている超臨界水をカテコール基導入の反応に用いることを試みた。

#### 【0019】使用する材料

本発明では、原料としてリグナン化合物を使用する。リグナン化合物には、セサミン、エピセサミン、ピノレジノール、オイデスミンなどの化合物が知られている。本発明の方法では、リグナン化合物のうちでも特に、分子内にメチレンジオキシフェニル基を有する化合物、例えばセサミン、エピセサミンなどを原料として使用することが好ましい。本発明において使用するリグナン化合物は、例えば特開平3-27319に記載の方法により抽出することができる。本発明の方法では、これらリグナン化合物を超臨界水分解処理の原料として使用し、目的とする抗酸化剤を探索することができる。あるいは、ゴマ油の製造工程で生じる脱臭スカムを直接超臨界水分解処理の原料として用いて、目的とする抗酸化剤を探索することもできる。

#### 超臨界水分解反応の条件

本発明で用いることのできる超臨界水分解反応は、酸触媒を用いずに加水分解反応を行うことができる超臨界状態の水の性質を利用したものである。物質には固体、液体、気体の3つの状態がある。気体と液体が混じり合っている状態で徐々に温度を上げ、ある特定の温度と圧力（臨界点）を超えると、気体と液体の境界面が消失して両者が渾然一体となった流体の状態となる。こうした流体は超臨界流体といわれ、気体と液体の中間の性質を持つ高密度の流体である。すなわち液体のように種々の物質を溶解する性質とともに気体のように高い流動性を持っている。

【0020】水の臨界点は温度374℃及び圧力221気圧であり、超臨界水とは、この臨界点を超えた特定の範囲の温度および圧力状態での水を意味する。超臨界水は温度、圧力に依存して密度、粘度、誘電率、イオン積および拡散係数等の値が連続的に変化する。反応溶媒として重要な指標である超臨界水への溶質の溶解度は密度の増大とともに大きくなることが知られている。溶解性にかかわるもう一つの重要な要素は誘電率である。誘電率は密度の増大とともに大きくなり、温度の上昇につれて減少することが知られている。

【0021】超臨界状態のように温度が十分に高ければ誘電率は非常に小さくなり、超臨界水はイオン間の静電気力を遮蔽することがほとんどできなくなる。この条件下では溶解しているイオン種の多くはイオン対として存在することになり、したがって超臨界水は極性物質というよりも非極性物質として挙動する。超臨界状態の水の

pHは約4であり、水素イオン濃度は1/10000となるが、同時に水酸イオン濃度も1/10000である。このように超臨界水は常温の液体での水と全く異なる性状であることがわかる。

【0022】超臨界水分解反応に際して、分解反応させる化合物と水は、例えば化合物1に対して水を約1から1000の割合、好ましくは水約5から200の割合で混合する。反応容器は超臨界水反応を行うために適する任意のものでよく、製造規模に応じて適宜選択できる。例えば容量が約1 mlから10 L、好ましくは約10 mlから1 Lの密閉容器（好ましくはSUS合金等の金属製）を使用する。

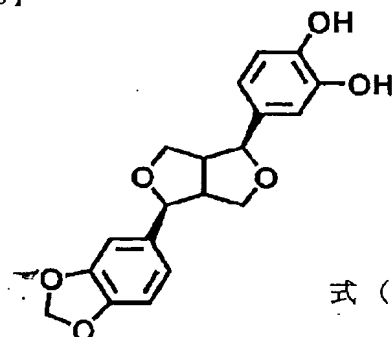
【0023】この容器中におおよそ30から40% (V/V)、好ましくは32から35% (V/V) の水を充填し、これに上記の割合で反応させる化合物を添加する。また、超臨界水分解反応は嫌気状態で行うことが好ましく、そのために容器内を脱気するか、窒素あるいはアルゴン等の不活性ガスで十分に容器内部及び水中の溶存酸素を置換して密閉する。反応は約374℃の温度（このときの圧力は約221気圧以上とする）から約500℃の温度（約300気圧以上）下において、水がいわゆる超臨界状態にある条件下で、あるいは約300℃（約150～200気圧）を超えるいわゆる亜臨界状態の条件下で行うことができる。処理時間は、亜臨界状態または超臨界状態に達した後10分以内、好ましくは亜臨界状態または超臨界状態に達した後60秒以内である。処理の時間及び温度の条件は反応させる化合物の種類及び目的とする構造体により、あるいは製造規模などの各種条件によって、上記範囲から適宜選択することができる。

#### 【0024】抗酸化剤

本発明の一態様では、リグナン化合物を超臨界水分解反応することにより、リグナン化合物中のメチレンジオキシフェニル基のうち一方または両方をカテコール基に変換した抗酸化剤を製造した。具体的には、リグナン化合物の一つであるセサミンを超臨界水分解反応することにより、式 (I) :

#### 【0025】

#### 【化8】



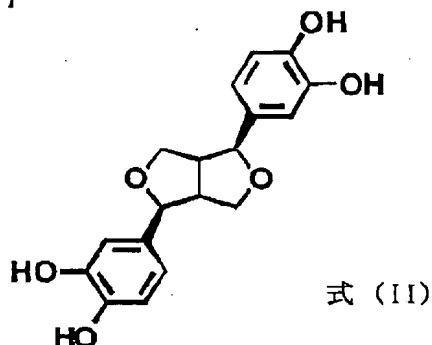
式 (I)

【0026】および、式 (II) :

【0027】

9

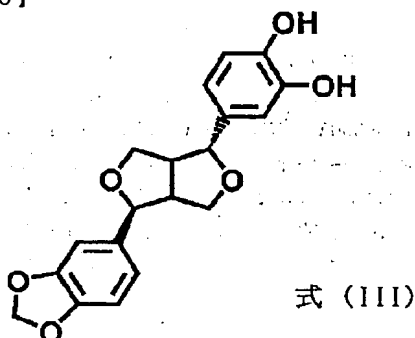
【化 9】



【0028】で示される化合物を得ることができ、リグナン化合物の一つであるエビスサミンを超臨界水分解反応することにより、式 (III) :

【0029】

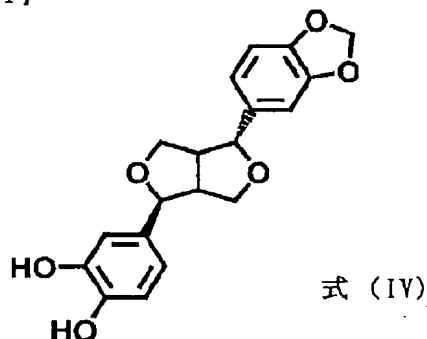
【化 10】



【0030】式 (IV) :

【0031】

【化 11】

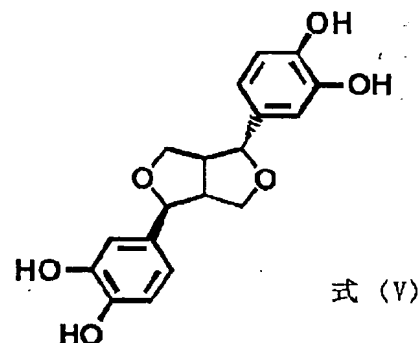


【0032】および式 (V) :

【0033】

【化 12】

10



10

【0034】で示される化合物を得ることができた。本発明の方法で得られる抗酸化組成物は、超臨界水により加水分解されて得られたものであるため、酸またはアルカリ等の加水分解触媒物質を全く含まないことを特徴としている。したがって、得られた抗酸化組成物は、医薬品、化粧品、食品等のいずれの分野においても安全に使用することができる。

【0035】特に、本発明のセサミンまたはエビスサミンのジカテコール体化合物 (式 (II) および式 (V) の化合物) は、抗酸化活性の評価の結果から、 $O_2^{\cdot -}$ のみならず、 $\cdot OH$ に対しても消去活性を示すことが明らかになった。これらの化合物が分子内にカテコール基を2つ持っているために、 $\cdot OH$ に対しても消去活性が獲得できたと考えられる。

【0036】本発明の方法で得られる抗酸化組成物は、活性酸素の影響により体内で生じる発癌、炎症、虚血性臓器障害、動脈硬化などの種々の障害や疾患、老化に対する治療用および/または予防用組成物として使用することができる。抗酸化組成物の投与経路は、経口投与が最も好ましいが、静脈内投与、腹腔内投与、皮下投与、筋肉内投与などであってもよい。経口投与に適した製剤には、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、溶液剤、シロップ剤などが含まれるが、これに限定されない。治療用および/または予防用組成物には、薬剂的に許容できる担体として、当該技術分野で公知の適当な賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色料、着色剤、溶解補助剤、懸濁剤、コーティング剤などを含んでもよい。

【0037】本発明の方法で得られた抗酸化組成物は、皮膚または粘膜の老化、発癌または炎症、もしくは皮膚の日焼けなどの皮膚または粘膜に関する種々の症状を治療または改善するための経皮投与用外用医薬品または化粧品として使用することもできる。外用医薬品または化粧品として適した財形としては溶液剤、パップ剤、貼布剤などが含まれる。外用医薬品には、薬剂的に許容できる担体として、賦形剤、着色料、着色剤、溶解補助剤、懸濁剤などを含んでもよい。

【0038】本発明の超臨界水分解反応により得られた抗酸化組成物は、食品の形で提供することもできる。好ましい食品の形態としては粉末、顆粒、ペースト状、ゼ

リー状などが挙げられる。さらに顆粒等にする場合は、甘味を加えるために乳糖などの糖類を加えることもできる。また、本発明の超臨界水分解反応で得られた抗酸化剤は、飲料の形で提供することもできる。このような食品または飲料には、リグナン化合物の他に、ビタミン剤、カルシウムなどの無機成分、アルコール類などを追加してもよい。この食品または飲料には、特定保健用食品、病者用食品等の範疇にあるものも含まれる。

#### 【0039】

【実施例】本発明を以下の実施例によりさらに詳しく説明するが、これにより本発明の範囲を限定するものではない。本発明の方法を種々変更、修飾して使用することが当業者には可能であり、これらも本発明の範囲に含まれる。

#### 【0040】実施例1 セサミン/エピセサミンからの抗酸化剤の製造

##### 方法

セサミンとエピセサミンの混合物(6:4)200mgをSUS合金製の反応容器(内容量10ml)に入れ、窒素置換した蒸留水3.2mlを添加し、反応容器内を窒素封入した後、熱電対を取り付けたネジ蓋にて密封した。400℃に保温中の樹脂製バスに反応容器を入れ、反応液の温度が水の臨界点である374℃に到達してから45秒後に反応容器を取り出し氷冷した。反応生成物はエタノールを用いて回収し、次の条件でHPLCを用い、分取、精製を行った後、凍結乾燥した；カラム：ODS-UG-5(20φ×250mm、野村化学社製)、流速：5ml/min、検出：280nm、20%から80%アセトニトリルのグラジエント溶出(100分間)。超臨界水分解反応を行うことにより、セサミン(化合物A)はピークB及びピークCの生成物に、またエ

#### 【0041】化合物の分析結果

##### 化合物B(式(I)の化合物)

ピークBの質量分析 (M-H)<sup>-</sup>=341

ピークBの核磁気共鳴スペクトル

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>中、TMS標準) ; 8.84 ppm (brs, 2H), 6.90 ppm (d, J=1.4 Hz, 1H), 6.85 ppm (d, J=8.0 Hz, 1H), 6.82 ppm (dd, J=1.4, 8.0 Hz, 1H), 6.71 ppm (d, J=2.0 Hz, 1H), 6.66 ppm (d, J=8.0 Hz, 1H), 6.57 ppm (dd, J=2.0, 8.0 Hz, 1H), 5.97 ppm (s, 2H), 4.61 ppm (d, J=4.3 Hz, 1H), 4.52 ppm (d, J=4.3 Hz, 1H), 4.10 ppm (dd, J=6.8, 8.9 Hz, 1H), 4.06 ppm (dd, J=6.8, 8.9 Hz, 1H), 3.71 ppm (dd, J=3.6, 9.1 Hz, 1H), 3.69 ppm (dd, J=3.6,

9.1 Hz, 1H), 2.95 ppm (m, 2H) <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>中、TMS標準) ; 147.5 ppm, 146.5 ppm, 145.1 ppm, 144.7 ppm, 135.6 ppm, 132.3 ppm, 119.4 ppm, 117.1 ppm, 113.6 ppm, 106.6 ppm, 100.9 ppm, 84.99 ppm, 84.97 ppm, 71.1 ppm, 70.8 ppm, 53.9 ppm, 53.6 ppm 化合物C(式(II)の化合物)

ピークCの質量分析 (M-H)<sup>-</sup>=329

ピークCの核磁気共鳴スペクトル

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>中、TMS標準) ; 6.72 ppm (d, J=1.9 Hz, 2H), 6.66 ppm (d, J=8.1 Hz, 2H), 6.58 ppm (dd, J=1.9, 8.1 Hz, 2H), 4.51 ppm (d, J=4.2 Hz, 2H), 4.06 ppm (dd, J=6.8, 8.9 Hz, 2H), 3.67 ppm (dd, J=3.4, 8.9 Hz, 2H), 2.92 ppm (m, 2H) <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>中、TMS標準) ; 145.0 ppm, 144.5 ppm, 132.3 ppm, 116.9 ppm, 115.2 ppm, 113.5 ppm, 84.9 ppm, 70.7 ppm, 53.6 ppm

化合物E(式(III)および式(IV)の化合物)

ピークEの質量分析 (M-H)<sup>-</sup>=341

化合物F(式(V)の化合物)

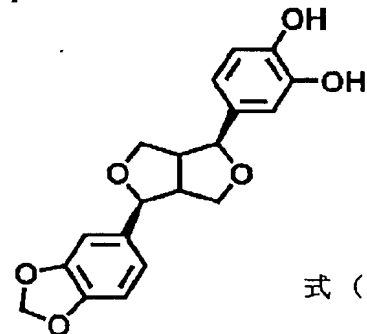
ピークFの質量分析 (M-H)<sup>-</sup>=329

##### 抗酸化活性の評価

セサミンの超臨界水分解反応で得られたピークB及びCは、上に示したNMRスペクトルの解析からそれぞれ式(I) : (1R,2S,5R,6S)-6-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-2-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-3,7-ジオキサビシクロ[3,3,0]オクタン；

#### 【0042】

##### 【化13】



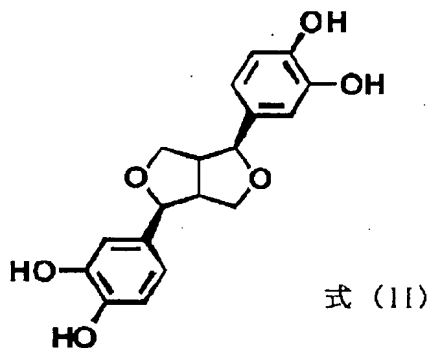
式(I)

【0043】および式(II) : (1R,2S,5R,6S)-2,6-ビス(3,4-ジヒドロキシフェニル)-3,7-ジオキサビシクロ[3,3,0]オクタン；

#### 【0044】

##### 【化14】

13

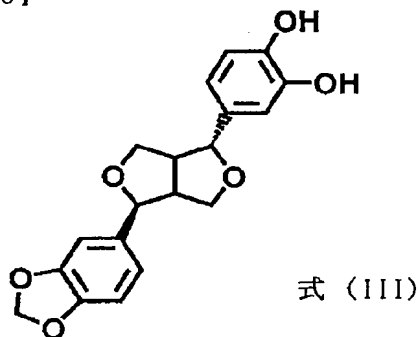


【0045】の化合物であると同定した。一方、エピセサミンの超臨界水分解反応で得られた化合物も分子量342及び330の化合物であった。ピークEの化合物は、<sup>1</sup>H NMRを測定した結果、メチレンジオキシフェニル基由来のシグナルが2H分しか観測されず、その他のピークに関してはエピセサミンの<sup>1</sup>H NMRスペクトルに類似しており、エピセサミンの1ヶ所のメチレンジオキシフェニル基がカテコール基に変換された化合物であると同定できた。また、ピークFの化合物は、<sup>1</sup>H NMRを測定した結果、メチレンジオキシフェニル基由来のシグナルが全く観測されず、その他のピークに関してはエピセサミンの<sup>1</sup>H NMRスペクトルに類似しており、エピセサミンの2ヶ所のメチレンジオキシフェニル基が両方ともカテコール基に変換された化合物であると同定できた。

【0046】これらのことから、ピークEの化合物は式 (III) : (1R,2S,5R,6R)-6-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-2-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-3,7-ジオキサビシクロ[3,3,0]オクタン

【0047】

【化15】

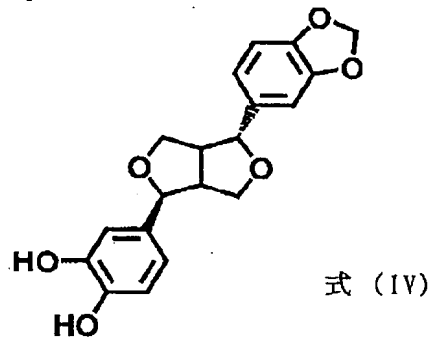


14

【0048】および式 (IV) : (1R,2R,5R,6S)-6-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-2-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-3,7-ジオキサビシクロ[3,3,0]オクタン:

【0049】

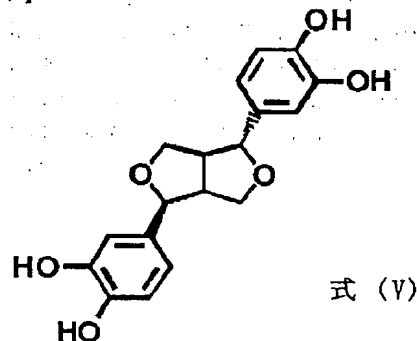
【化16】



【0050】そしてピークFの化合物は式 (V) : (2R,6S)-2,6-ビス(3,4-ジヒドロキシフェニル)-3,7-ジオキサビシクロ[3,3,0]オクタン:

【0051】

【化17】



【0052】であると同定した。今回得られた分子内にカテコール基を2つ有する化合物、すなわち式 (II) および式 (V) で示される化合物は新規物質である。なお、HPLCのクロマトグラムのピークEには2つの化合物が混ざっており、式 (III) および式 (IV) で示される立体異性体の混合物であった。

【0053】次に、これら超臨界水分解反応により得られた各化合物の収率を下に示す。

【0054】

【表1】

化合物の種類	収量 (mg)	収率 (%)
式 (I)	10.8	9.0
式 (II)	2.2	1.8
式 (III) + 式 (IV)	4.8	6.0
式 (V)	1.2	1.5

### 【0055】実施例2 ゴマ脱臭スカムからの抗酸化剤の製造

#### 方法

ゴマ油製造過程の脱臭、脱色過程で生じる脱臭スカムはリグナン化合物を含有している。この脱臭スカムに対して超臨界水分分解反応を行うことにより、抗酸化性を有する化合物を次のように得た。脱臭スカム1 gをSUS合金製の反応容器（内容量10 ml）に入れ、窒素置換した蒸留水3.2 mlを添加し、反応容器内を窒素封入した後、熱電対を取り付けたネジ蓋にて密封した。400℃に保温中の樹脂製バスに反応容器を入れ、反応液の温度が水の臨界点である374℃に到達してから45秒後に反応容器を取り出し氷冷した。反応物はエタノールを用いて回収した後、実施例1と同様の手法によりHPLCを用いて分取および生成物の分析を行った。この結果、式(I)～(V)の化合物が主な生成物として生成していた。各化合物の収量は、式(I)：4.5 mg、式(II)：2.7 mg、式(III)及び(IV)の混合物：5.3 mg、式(V)：2.5 mgであった。

#### 【0056】抗酸化活性の評価

セサミン及びエビスセサミンの混合物(6:4)、式(I)で示される化合物(セサミンのモノカテコール体)、式(II)で示される化合物(セサミンのジカテコール体)、式(III)及び式(IV)で示される化合物の混合物(エビスセサミンのモノカテコール体の異性体混合物)、式(V)で示される化合物(エビスセサミンのジカテコール体)及び $\alpha$ -トコフェロールの抗酸化活性を下記に記載のようにして測定した。

#### 【0057】スーパーオキシドアニオンラジカル消去活性の測定方法

スーパーオキシドアニオンラジカル消去活性を以下に示した方法で調べた。2 mMのヒポキサンチン(0.1 Mリン酸緩衝液、pH 7.4に溶解) 50  $\mu$ l、5.5 mMのジエチレントリアミン五酢酸(同0.1 Mリン酸緩衝液に溶解) 35  $\mu$ l、200  $\mu$ Mのサンプル(アセトニトリルに溶解) 50  $\mu$ l、8.97 Mの5,5-ジメチル-1-ピロリン-N-オキシド(DMPO) 15  $\mu$ lをマイクロチューブに添加して攪拌後、0.4 unit/mlのキサンチンオキシダーゼ(XOD)を50  $\mu$ l加えて更に10秒間攪拌する。反応液をフラットセルに入れ、ESR装置にセットし、キサンチンオキシダーゼを添加した時点から60秒後に磁場掃引を開始した。ESR測定条件は次のとおりである。Power: 4 mW、C.Field: 335.5 mT、SwWid(±): 5 mT、SwTime: 2 min、ModWid: 0.1 mT、Amp: 160、TimeC: 0.1 sec、Temperature: 20℃。DMPO-OHの4組のESRシグナルのうち最も定磁場側のシグナルの、内部標準のMn<sup>2+</sup>のシグナルの高さに対する比(S/M)をO<sub>2</sub><sup>•</sup>量とし、次式で表すように消去活性を算出した。

【0058】O<sub>2</sub><sup>•</sup>消去活性(%) = 100 - {100 × (サンプル存在下のS/M) / (サンプル非存在下のS/M)}

#### ヒドロキシラジカル消去活性の測定方法

ヒドロキシラジカル消去活性を以下に示した方法で調べた。0.2 mM・FeSO<sub>4</sub>、0.2 mMジエチレントリアミン五酢酸(0.1 Mリン酸緩衝液、pH 7.4に溶解) 75  $\mu$ l、1 mMのサンプル(アセトニトリルに溶解) 50  $\mu$ l、0.897 MのDMPO(0.1 Mリン酸緩衝液、pH 7.4に溶解) 20  $\mu$ lをマイクロチューブに入れて攪拌後、10 mMのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.1 Mリン酸緩衝液、pH 7.4に溶解) 75  $\mu$ lを加えて更に10秒間攪拌した。反応液をフラットセルに入れ、ESR装置にセットし、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を添加してから60秒後に磁場掃引を開始した。ESR測定条件は次のとおりである。Power: 4 mW、C.Field: 335.5 mT、SwWid(±): 5 mT、SwTime: 2 min、ModWid: 0.1 T、Amp: 160、TimeC: 0.1 sec、Temperature: 20℃。DMPO-OHの4本のESRシグナルのうち最も定磁場側のシグナルの、内部標準のMn<sup>2+</sup>のシグナルの高さに対する比(S/M)で・OH量とし、次式で表すように活性の強さを算出した。

【0059】OH消去活性(%) = 100 - {100 × (サンプル存在下のS/M) / (サンプル非存在下のS/M)}

#### 1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジン(DPPH)消去活性の測定方法

1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジン(DPPH)消去活性を以下に示した方法で調べた。10  $\mu$ Mのサンプル(50%アセトニトリルに溶解) 100  $\mu$ l、60  $\mu$ MのDPPH 100  $\mu$ lをテストチューブに入れ10秒間攪拌した。反応液をフラットセルに入れ、ESR装置にセットし、1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジンを添加してから60秒後に磁場掃引を開始した。ESR測定条件は次のとおりである。Power: 4 mW、C.Field: 335.5 mT、SwWid(±): 5 mT、SwTime: 0.5 min、ModWid: 0.2 mT、Amp: 500、TimeC: 0.3 sec、Temperature: 20℃。DPPHの5本のESRシグナルのうち定磁場側から2本目のシグナルの、内部標準のMn<sup>2+</sup>のシグナルの高さに対する比(S/M)でDPPH量とし、次式で表すように活性の強さを算出した。

【0060】DPPH消去活性(%) = 100 - {100 × (サンプル存在下のS/M) / (サンプル非存在下のS/M)}

#### 脂質過酸化抑制活性の測定方法

脂質過酸化抑制活性を以下に示した方法で調べた。第1段階目の脂質過酸化反応を、10 mg/mlのホスファチジルコリンを100  $\mu$ l、200  $\mu$ Mのサンプル(アセトニトリルに溶解)を50  $\mu$ l、510 mM 2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオンアビジン)塩酸塩を20  $\mu$ lのそれぞれをマイクロチューブに入れて攪拌し、37℃で1時間インキュベートして行なった。第2段階のチオバルビツール酸反応生成物(TBARS)の定量は、上記の第1段階目の脂質過酸化反応液100  $\mu$ l、120 mM DPTBA(アセトニトリルに溶解) 50  $\mu$ l、200 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 2.0) 250  $\mu$ lをテストチューブに入れて攪拌し、100℃で30分間反応させた。反応液に1 mlのn-ブタノールを加えてよく攪拌し、3,000 rpmで10分間遠心処理した後、上層のブタ

ノール層を石英セルに移し、蛍光光度計にて蛍光強度を読み取った (Ex. 532 nm, Em. 553 nm)。検量線は第1段階目の脂質過酸化反応液の代わりに0、1、2.5、5、10、15および20  $\mu$ Mの1,1,3,3-テトラメトキシプロパン (TEP) 溶液100  $\mu$ lを用いて第2段階の反応を行ない、TEP溶液の濃度と蛍光強度との間で得られる一次回帰直線を求めて作成した。

【0061】この評価方法は、脂質の過酸化度を間接的に推定する方法である。不飽和脂肪酸が活性酸素やフリーラジカルによる脂質過酸化連鎖反応とそれに続く分解によって生成するマロンジアルデヒド (MDA) を、チオバルビツール酸 (TBA) などのアミノ化合物と縮合反応させ、赤色反応物質 (TBARS) を生成させる。この赤色反応物質の蛍光強度を測定することにより、過酸化脂質の分解に伴う二次の生産物であるMDAの定量を行い、間接的に脂質の過酸化の程度を推定する方法である。サンプルを添加していないコントロールよりも低濃度のTBARSしか生じていなければ抑制活性があるとする。

【0062】各化合物の抗酸化活性の測定結果は次のようであった (図3～図6)。スーパーオキシドアニオンラジカル消去活性 (サンプル濃度50  $\mu$ M) を評価した結果、セサミン/エピセサミン混合物と $\alpha$ -トコフェロールには活性が認められなかった。セサミン及びエピセサミンのモノカテコール体及びジカテコール体は50%以上の $O_2^{\cdot -}$ を消去させる活性を示した (図3)。

【0063】ヒドロキシラジカル消去活性 (サンプル濃度227  $\mu$ M) を評価した結果、セサミン及びエピセサミンのジカテコール体に消去活性が認められた (図4)。DPPH消去活性 (サンプル濃度5  $\mu$ M) を評価した結果、セサミン及びエピセサミンそれぞれのカテコール体、ジカテコール体と $\alpha$ -トコフェロールに消去活性が認められた。特にセサミン及びエピセサミンのジカテコール体では50%以上の消去活性が認められた (図5)。

【0064】脂質過酸化抑制活性 (サンプル濃度58.8  $\mu$ M) を評価した結果、セサミン及びエピセサミンのモノカテコール体及びジカテコール体に50%以上の抑制活性が認められた。セサミン/エピセサミン混合物には活性が見られなかった。 (図6)。

#### 【0065】

【発明の効果】メチレンジオキシフェニル基を有する有機化合物に超臨界水分解反応を用いることで、一般的な有機合成法では合成が困難な化合物の製造ができる。セサミンのような2つのメチレンジオキシフェニル基を有するリグナン化合物について超臨界水分解反応を行えば、1工程でメチレンジオキシフェニル基がカテコール基に変換された化合物の合成ができる。

【0066】セサミンまたはエピセサミンに対して超臨

界水分解反応を行うことにより得られた式 (I) ～式

(V) で表される化合物はセサミンまたはエピセサミンと比較して抗酸化作用が優れており、医薬品や食品への応用ができる。特に、本発明のセサミンまたはエピセサミンのジカテコール体化合物は、抗酸化活性の評価の結果から、 $O_2^{\cdot -}$ のみならず、 $\cdot OH$ に対しても消去活性を示すことが確認された。リグナン化合物を原料としたジカテコール体化合物で $\cdot OH$ 消去作用を有する抗酸化剤が得られることは、本発明において初めて明らかになったものである。

【0067】また、超臨界水分解反応は、溶媒として水のみを用いるので、従来の合成法で生じる廃溶媒が全く生じず、環境にやさしい製造法である。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、リグナン化合物のメチレンジオキシフェニル基を、臭化アルミニウム ( $AlBr_3$ ) とエタンチオール ( $CH_3CH_2SH$ ) を使用する分解反応により、カテコール基に変換するための従来技術における方法を示す図である。従来の一般的な有機化学合成の手法である臭化アルミニウムとエタンチオールとを用いて $-78^\circ C$ から室温までの種々の温度でセサミンのメチレンジオキシフェニル基をカテコール基に変換させようとする、ベンジルエーテル部位が優先的に反応してしまい、目的とするカテコール化合物が得られなかった。

【図2】 図2は、セサミンとエピセサミンとの混合物 (6:4) に対して超臨界水分解反応を行った時の反応前後におけるHPLCクロマトグラム (左が反応前、右が反応後) を示す。超臨界水分解反応を行うことにより、セサミン (ピークA) から2種類の化合物 (ピークB及びピークC) が生成した。またエピセサミン (ピークD) からは同様に2種類 (立体異性体を含めると3種類) の化合物が生成した (ピークE、F)。

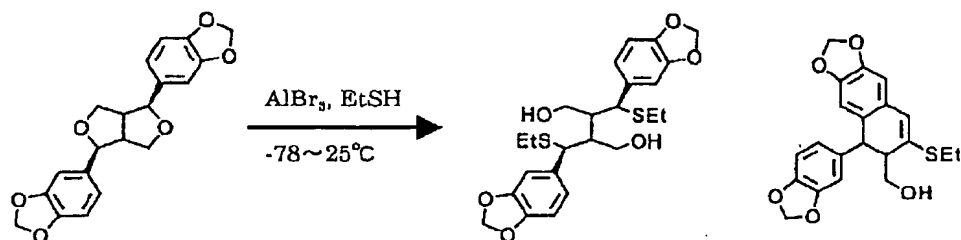
【図3】 図3は、セサミン、エピセサミン及びそれらの超臨界水分解反応物のスーパーオキシドアニオンラジカル消去活性を%表示で示す。比較対照として $\alpha$ -トコフェロールを用いた。

【図4】 図4は、セサミン、エピセサミン及びそれらの超臨界水分解反応物のヒドロキシラジカル消去活性を%表示で示す。比較対照としては $\alpha$ -トコフェロールを用いた。

【図5】 図5は、セサミン、エピセサミン及びそれらの超臨界水分解反応物のDPPH消去活性を%表示で示す。比較対照としては $\alpha$ -トコフェロールを用いた。

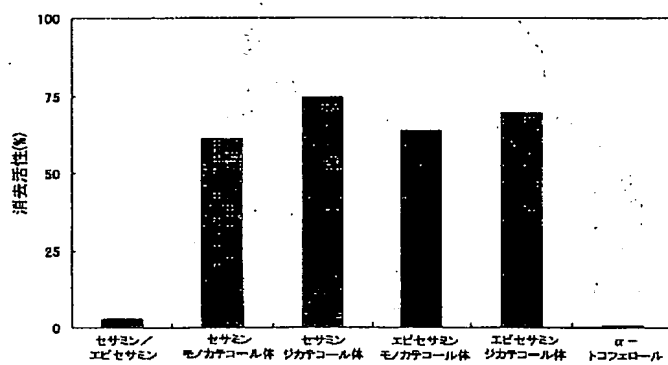
【図6】 図6は、セサミン、エピセサミン及びそれらの超臨界水分解反応物の脂質過酸化抑制活性を%表示で示す。比較対照としては $\alpha$ -トコフェロールを用いた。

【図 1】



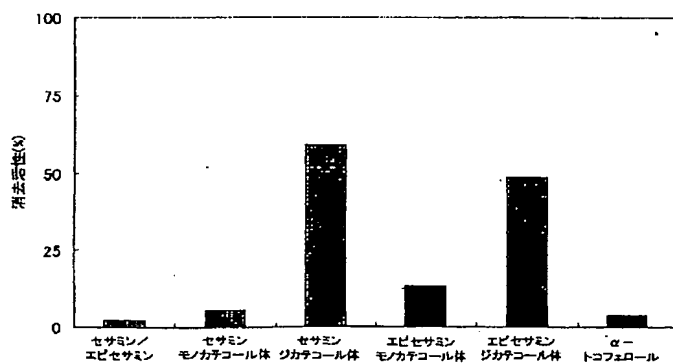
【図 3】

スーパーオキシドアニオンラジカル消去活性



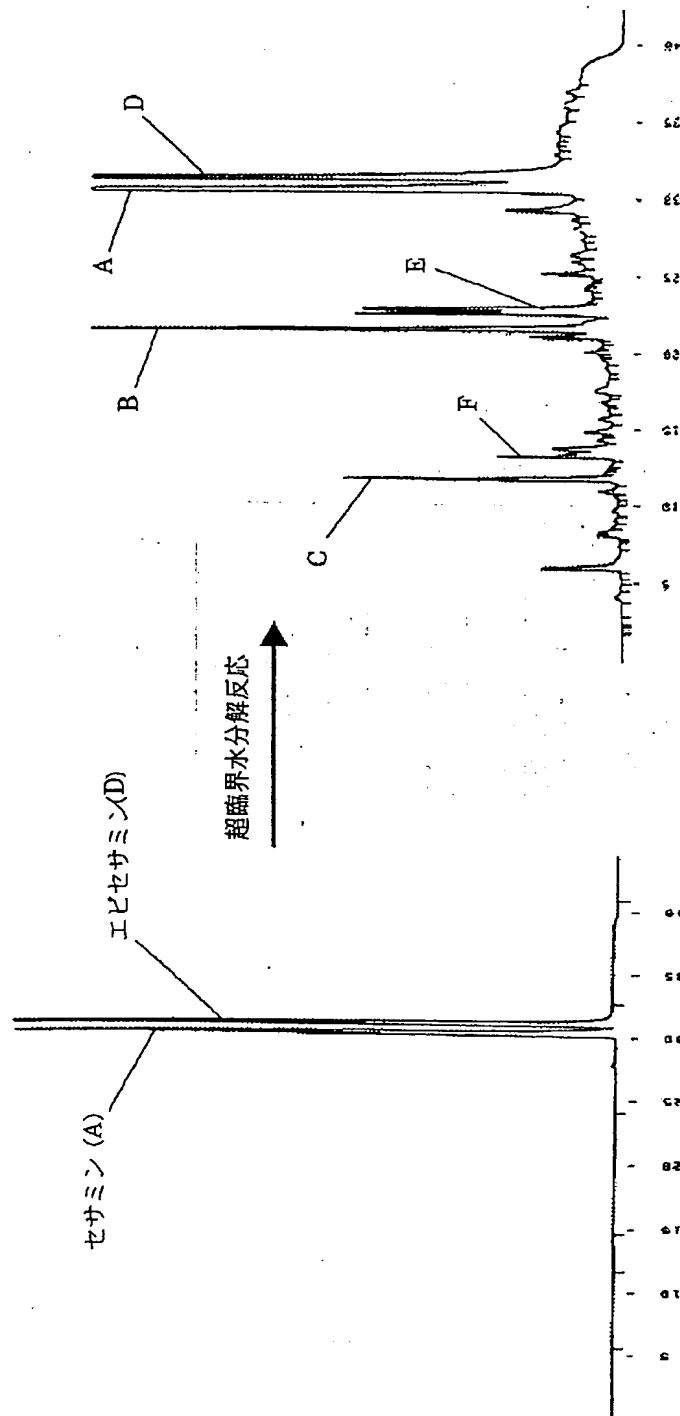
【図 4】

ヒドロキシラジカル消去活性

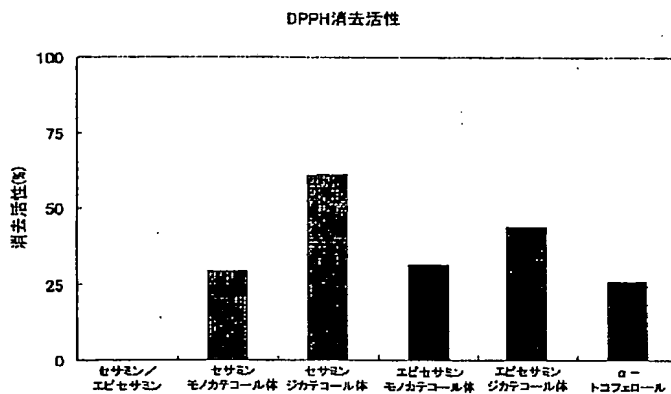




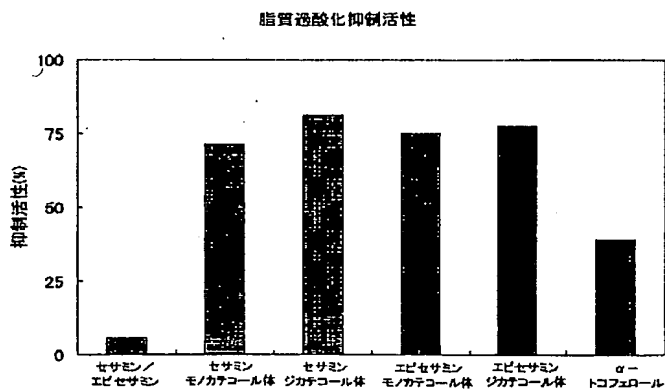
【図2】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

A 6 1 P 43/00

識別記号

1 1 1

F I

A 6 1 P 43/00

テーマコード (参考)

1 1 1

(72) 発明者 幹 渉

大阪府三島郡島本町若山台 1 丁目 1 番 1 号  
サントリー株式会社基礎研究所内

F ターム (参考)

4B021 MC03 MK25 MP01  
4C071 AA01 BB01 CC12 DD05 EE05  
FF15 GG03 LL01  
4C086 AA01 AA02 AA04 CA01 MA01  
MA04 NA14 ZA36 ZA45 ZB11  
ZB26

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**